

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-137000

(43)Date of publication of application : 26.05.1998

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68
G01N 33/15
G01N 33/50
G01N 33/53
G01N 33/566
// C12N 15/09

(21)Application number : 08-305486

(71)Applicant : SUNTORY LTD

TANIGUCHI NAOYUKI

(22)Date of filing : 01.11.1996

(72)Inventor : TANIGUCHI NAOYUKI

(54) SCREENING OF METASTASIS SUPPRESSOR

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for screening a metastasis suppressor by utilizing that a GnT-V enzyme participates in metastasis and Etx-1 protein participates in transcriptional control of gene, and a kit for screening the suppressor.

SOLUTION: DNA comprising the following base sequences: 5'-GGGAGTGA-GGATGATGTAGGGAAG-3' (sequence No.1), 5'- ATGGGGCAGAGGAACCTTACGTTAT-3' (sequence No.2) or at least either one thereof, (b) Ets-1 protein or its fragment and (c) a sample are together incubated and binding of the DNA (a) to Ets-1 protein or its fragment (b) is measured. The method is useful for primary screening of metastasis suppressor.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

30.10.2003

[Date of sending the examiner's decision of
rejection]

[Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-137000

(43)公開日 平成10年(1998)5月26日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

FI

C12Q 1/68

ZNA

C12Q 1/68

ZNAA

G01N 33/15

G01N 33/15

Z

33/50

33/50

P

33/53

33/53

M

33/566

33/566

審査請求 未請求 請求項の数2 FD (全11頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平8-305486

(22)出願日

平成8年(1996)11月1日

(71)出願人 000001904

サントリー株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号

(71)出願人 592196101

谷口 直之

大阪府豊中市上野東2-19-32-201

(72)発明者 谷口 直之

大阪府豊中市上野東2-19-32-201

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

(54)【発明の名称】 癌転移抑制物質のスクリーニング方法

(57)【要約】

【課題】 癌転移抑制物質の新規なスクリーニング方法の提供。

【解決手段】 (a) 下記の塩基配列: 5'-GGGAGTGAGGATGATGTAGGGAAG-3' (配列番号: 1)、5'-ATGGGGGCAGAGGAAC TTACGTTAT-3' (配列番号: 2)、又はその少なくとも一方を含有するDNAと; (b) Ets-1蛋白質又はその断片と; (c) 試料と、を一緒にインキュベートし、そして前記DNA (a) とEts-1蛋白質又はその断片との結合を測定することを特徴とする癌転移抑制物質のスクリーニング方法。

【効果】 癌転移抑制物質の一次スクリーニングのために有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 下記の塩基配列:

5' -GGGAGTGAGGATGATGTAGGGA
AG-3' (配列番号: 1)

5' -ATGGGGCAGAGGAACCTTACGTT
AT-3' (配列番号: 2)

又はその少なくとも一方を含有するDNAと、

(b) Ets-1蛋白質又はその断片と、

(c) 試料と、を一緒にインキュベートし、そして前記DNA (a) とEts-1蛋白質又はその断片との結合を測定することを特徴とする癌転移抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項2】 (a) 下記の塩基配列:

5' -GGGAGTGAGGATGATGTAGGGA
AG-3' (配列番号: 1)

5' -ATGGGGCAGAGGAACCTTACGTT
AT-3' (配列番号: 2)

又はその少なくとも一方を含有するDNAと、

(b) Ets-1蛋白質又はその断片と、からなる前記DNA (a) とEts-1蛋白質又はその断片との結合測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は癌転移抑制物質のスクリーニング方法及びそのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】 膜糖タンパク質のアスパラギン残基に結合する細胞表面オリゴ糖は、種々の特定の生物学的相互作用に関与していると思われる (Hakomori, S. I. (1989) Adv. Cancer Res. 52, 257-331)。N-グリカンの枝分れの増加は癌可能性に関連されていると思われ、特にN-グリカンの β 1-6枝分れの増加は腫瘍転移増強に直接的に関連している (Dennis J. W. ら、(1987) Science 236, (582-585) など)。この構造体は、図1に示されるように、UDP-N-アセチルグルコサミン: α -6-D-マンノシド β 1-6-N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼV (GnT-V) [EC 2.4.1.155] により合成される。

【0003】 GnT-Vは、N-グリカンオリゴ糖の β 1-6結合された枝分れを生成するためにUDP-N-アセチルグルコサミンから α -6-D-マンノシドへのN-アセチルグルコサミンのトランスファーを触媒して、ポリラクトサミン含有量を制御する。17のエクソンを含み、そして15.5kbに及ぶGnT-V遺伝子が本発明者ら、及び他のグループによりクローニングされた (Shoreibah, M. ら、(1992) J. Biol. Chem. 267, 2920-2927; Gu, J. ら、(1993) J. Biochem. 113, 111-116)。この遺伝子は、組織-及び細胞タイプ-特異的

態様で発現され、そして複数のプロモーターにより転写のレベルで調節される (Saito, H. ら、N. (1995) Eur. J. Biochem. 233, 18-26)。

【0004】 GnT-V遺伝子の発現は、ウィルス及び腫瘍遺伝子トランスフェクション、TGF β 及びホルボールエステルにより誘発され (Yamashita K. ら、J. Biol. Chem. 260 3963-3969)、その誘発のための複雑化な機構が存在することを示唆される。Ets転写因子ファミリーは、通常のコアトリヌクレオチド配列、GGAを含む配列と特異的に相互作用する通常のDNA-結合ドメインを共有する (Wasyluk, B. ら、(1993) Eur. J. Biochem. 211, 7-18)。

【0005】 Ets-結合部位 (EBS) はヒトTCR- α (Ho. I. C. ら、(1990) Science 250, 814-818) 及び β (Prosser, H. M. ら、(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9934-9938)、及びIL-2 β R (Thompson C. B. ら、(1992) Mol. Cell Biol. 12, 1043-1053)、並びに他の細胞及びウィルスエンハンサーの調節領域に同定されており、そしてそれらのEts-結合部位はそれらの転写活性を調節する (Wu, H. ら、(1994) Mol. Cell Biol. 14, 2129-2139)。Ets-1は複製欠陥レトロウィルスE26におけるvetsの細胞相同体として最初に記載され、そして腫瘍形成及び胚形成に関連していると思われる (Klaes, A. ら、(1994) Cell 78, 147-160)。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、上記のごとき、GnT-V酵素が癌の転移に関与していること、及びEts-1蛋白質が遺伝子の転写調節に関与していることを利用して、癌転移抑制物質をスクリーニングする方法及びそのためのキットを提供しようとするものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 前記のごとく、GnT-V遺伝子は癌の転移の促進に関与しており、Ets-1蛋白質は遺伝子の転写調節に関与しており、腫瘍形成などに関連することが知られている。本発明者らは、GnT-V遺伝子の転写・発現とEts-1蛋白質との関係を検討した結果、Ets-1蛋白質はGnT-V遺伝子の上流のプロモーター領域の特定の部位に結合し、GnT-V遺伝子の転写を促進することを見出し、上記課題を解決した。

【0008】 すなわち

(a) 下記の塩基配列:

5' -GGGAGTGAGGATGATGTAGGGA

AG-3' (配列番号: 1)

5' -ATGGGGCAGAGGAACTTACGTT
AT-3' (配列番号: 2)

又はその少なくとも一方を含有するDNAと、(b) Ets-1蛋白質又はその断片と、(c) 試料と、を一緒にインキュベートし、そして前記DNA (a) とEts-1蛋白質又はその断片との結合を測定することにより癌転移抑制物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0009】本発明はさらに、

(a) 下記の塩基配列:

5' -GGGAGTGAGGATGATGTAGGGA
AG-3' (配列番号: 1)

5' -ATGGGGCAGAGGAACTTACGTT
AT-3' (配列番号: 2)

又はその少なくとも一方を含有するDNAと、(b) Ets-1蛋白質又はその断片と、からなる前記DNA (a) とEts-1蛋白質又はその断片との結合測定用キットを提供する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明者らはまず、GnT-V遺伝子の上流のプロモーター領域の種々の部位をレポーター遺伝子としてのルシフェラーゼ遺伝子(プロモーターを除去したもの)に連結して発現ベクターを構成し、Ets-1蛋白質を作用させながら、ルシフェラーゼ遺伝子の発現を測定した。また、上記GnT-V遺伝子のプロモーター領域の種々の部位とEts-1蛋白質との結合をゲル移動シフトアッセイ及びスーパースhiftアッセイにより測定した。

【0011】これらの測定により、GnT-V遺伝子のプロモーター領域中の、Ets-1蛋白質結合部位が次の部位:

E266 5' -GGGAGTGAGGATGATGT
AGGGAAG-3' -278~-255 (配列番号:
1)

E728 5' -ATGGGGCAGAGGAACTT
ACGTTAT-3' -741~-718 (配列番号:
2)

にあることが見出された。

【0012】従って、上記の配列又はそれを含有する配列を有するDNAとEts-1蛋白質との結合を阻害する物質を見出せば、それが癌の転移を抑制する物質である可能性が高い。従って、本発明においては、上記の配列又は上記の配列を含有する配列を有するDNAと、Ets-1蛋白質又は、その断片であって上記DNAと結合するものと、被検試料とをインキュベートし、前記DNAと蛋白質との結合が阻害されれば、癌転移抑制物質と推定する。従って本発明は、癌転移抑制物質の選択のための一次スクリーニング法として有用である。

【0013】

【実施例】次に、本発明を実施例によりさらに具体的に

説明する。

実施例1. ヒトGnT-V遺伝子の5' -非翻訳領域内での機能的調節要素の同定

ヒト胆管癌HuCC-T1細胞をJapanese Cancer Resources Bankから得た。それを、10%ウシ胎児血清(Life Technologies, Inc.)、50mg/mlのストレプトマイシンスルフェート及び50単位/mlのペニシリンにより補充されたRPMI 1640培地(Nakarai Tesque, Japan)において培養した。

【0014】GnT-V遺伝子の5' -上流領域をHuCC-T1細胞のゲノムからクローニングした(Saito, H. ら、(1995)、Eur. J. Biochem. 233, 18-26)。pGV-エンハンサーベクター(Toyo Ink Co., Ltd., Japan)のXhoI部位(クレノウ-フィルインされた)における、プロモーターを欠くルシフェラーゼ遺伝子の前方に種々の長さの5' -上流領域を挿入した。

【0015】この構造体は、それぞれエクソン1の2.2kb及び0.6kbの上流領域並びに1.0kbのイントロン1を含み、それぞれpGV-2760/-440 (SalI/XbaI、クレノウ-フィルインされた)、pGV-642/+23 (XbaI/PvuII、クレノウ-フィルインされた)、及びpGV-23/+1123と命名した(図2)。2μgのSV40プロモーターpGV-対照ベクター(レーン1)、プロモーターを欠くpGV-エンハンサーベクター(レーン2)、-2760/-440 pGV-構造体(レーン3)、-642/+23 pGV-構造体(レーン4)及び+23/+1123 pGV-構造体(レーン5)をそれぞれHuCC-T1細胞中に一過性にトランスフェクトした。

【0016】HuCC-T1細胞を、トランスフェクションの前、1日間、60mmの皿当たり 1.7×10^5 個の細胞でプレートした。それらを、2μgのレポータープラスミド、種々の発現ベクター及びpCH110 (Novagen)を含む種々の発現ベクター2~5μgを含むリポフェクタアミン試薬(Gibco BRL)によりトランスフェクトし、ここでβ-ガラクトシダーゼ発現ベクターをトランスフェクション効率を測定するために使用した。手短に言及すれば、希釈されたDNA2~5μg及びリポフェクタアミン試薬5μlを200μlの血清フリーRPMI 1640と共に混合し、DNA-リポソーム複合体を形成した。30分間のインキュベーションの後、800μlの血清フリー培地を前もってすすがれた細胞上に被覆した。

【0017】細胞を前記複合体と共に6時間インキュベートし、続いて20%ウシ胎児血清培地1mlを添加し、そしてさらに18時間インキュベートした。複合体を洗浄により除去した後、細胞を、10%FCSを含むRPMI 1640において24時間、培養した。細胞溶解物におけるルシフェラーゼ活性を、Pica GeneTM Lumines

cence Kit (Toyo Ink Co., Ltd., Japan) の使用により決定した。細胞溶解物における β -ガラクトシダーゼ活性を報告されているようにして決定し (Herbomel, P. ら, (1984) *Cell* 39, 653-662)、そしてトランスフェクション効率についての変動のための内部対照として使用した。その結果を図3に3~5回の独立した実験の平均 \pm S. D. で示す。

【0018】pGV-2760/+23 構成体におけるゲノム挿入体が負の要素を含む可能性を妨げるために、小さなゲノムフラグメントを含む2つの追加のpGVを分析した (pGV-2760/-440及びpGV-642/+23)。両構成体はルシフェラーゼ活性を発現したが、pGV-2760/-440は対照としてのSV40プロモーターベクターに比較して、低いプロモーター活性を示した。しかしながら、その対応する欠失された構成体、pGV-1460/-440は、対照のプラスミドの活性に比較して、強いプロモーター活性 (3.13倍) を示した (図4)。

【0019】それらの構成体の中で、pGV-642/+23は、プロモーターを欠くベクターに比較される場合、それは1.82倍のルシフェラーゼ活性を示し、pGV-2760/-440及びpGV+23/+1123はそれぞれ1.24倍及び1.69倍のルシフェラーゼ活性を示すので、最もも活性的であることがわかった。それらの結果は、それらの2つのフラグメントがプロモーターとして作用し、そして負の要素がpGV-2760/-1460構造体に存在することを強く示唆する。

【0020】実施例2. ヒトGnT-V遺伝子の5'-非翻訳領域の欠失分析

エクソン1の5'-非翻訳領域内にEts結合部位を含む潜在的な調節ドメインをさらに特徴づけるために、プラスミドpGV-2760/-440及びpGV-642/+23を用いてGnT-V 5'-非翻訳領域の一連の5'欠失構成体を調製し、そして次に、ルシフェラーゼ活性の決定のためにHuCC-T1細胞中にその欠失された構成体をトランスファーした (図2)。pGV-2760/-440及びpGV-642/+23の一連の5'欠失を、以前に記載されているようなネスティド欠失方法により生成した (Henikoff, S. (1987) *Methods Enzymol.* 155, 156-165)。欠失したヌクレオチド部位を一般的な配列分析により確かめた。

【0021】それぞれ長さ200bp及び100bpのエクソン1の上流のプラスミド、pGV-243/+23及びpGV-112/+23を、一組のオリゴヌクレオチドプライマー (センス、5'-ggacgcgtTCTTACCATATAGAAC-3' (配列番号: 3)、5'-ggacgcgtGCCTAGATGATCAGTC-3' (配列番号: 4) 及びアンチセンス、5'-ggctcgagGCCTCTTACTGTTTTC-

3' (配列番号: 5)) を用いてPCRにより増幅した。そのPCR生成物をpT7 Blue-Tベクター (Novagen) 中にサブクローン化し、配列決定し、そして次に、それらの配列を2.76kbのフラグメントの配列と比較した。個々のフラグメントをMluI及びXhoIの組合せにより消化し、続いてSV40エンハンサー要素のみを含むpGV-エンハンサーベクター (MluI/XhoI部位) 中にサブクローン化した。

【0022】pGV-2764/-440 (図4) 又はpGV-642/+23 (図5) をHuCC-T1細胞にトランスフェクトし、個々の欠失変異体の相対的ルシフェラーゼ活性を、3~5回の独立した実験について、HuCC-T1細胞におけるpGV-エンハンサーベクターの活性の%、すなわち平均 \pm S. D. として表す。

【0023】HuCC-T1細胞は内因性GnT-V活性を発現し、これは細胞がGnT-Vプロモーター活性のために必要とされる核因子を含むことを示唆する。それらの結果は図4及び5に示されており、ここでpGV-1460/-440構成体はpGV-EA-2760/-440に比較してルシフェラーゼ活性の2.5倍の上昇率を示し、これはその隣接する領域が遠い領域の完全な長さのものよりも一層活性的であることを示す。ヌクレオチド710bpに対する追加の欠失は、潜在的なEts-1結合部位 (位置728) を除去し、そしてルシフェラーゼ活性において3.4倍の低下をもたらす。

【0024】pGV-642/+23構成体に比較して、pGV-362/+23は一層のプロモーター活性を示し、これはこの領域がGnT-V遺伝子のコアプロモーターとして機能することを示す。ヌクレオチド243bpまで拡張する、この領域における欠失はもう1つのEts-1結合部位 (位置266) を除去し、ルシフェラーゼ活性における13.2倍の低下をもたらす。従って、最も近位の領域 (-362/-243) は遠位の領域 (-1460/-710) よりも約3.9倍活性的であり、これはGnT-V遺伝子の、上流領域における非常に高いルシフェラーゼ活性を示す。

【0025】それらの結果は、その近位の領域 (-362/-243) 及び遠位の領域 (-1460/-710) がHuCC-T1細胞においてGnT-V遺伝子のプロモーター活性を調節する正の調節要素として作用することを強く示す。しかしながら、約100bpのさらなる欠失 (pGV-112/+23) はHuCC-T1細胞における活性の8.3倍の上昇をもたらす、これは-2760/-1460要素のようにHuCC-T1細胞においてGnT-Vの転写を調節できる-243/-112領域における負の調節要素の存在を示す。

【0026】実施例3. GnT-V遺伝子の調節領域の推定上の配列へのEts-1タンパク質の結合の分析

上記の欠失分析は、このプロモーターの-1460/-710及び-362/-243領域がHuCC-T1-制限転写のためのcis-作用要素として作用することを示した。LBP-1 (位置-1334, -1038, -935及び-932)、AP-2 (位置-1264及び-227)、NF-IL6 (位置-1385, 1005, -965及び-255)、c-myb (位置-287)、及びEts-1 (位置728及び266) のためのいくつかの推定上の結合部位がそれらの2つの要素に含まれることが示されている。

【0027】腫瘍の悪性形質転換及び転移に関連するプロト腫瘍遺伝子の生成物である転写因子Ets-1のための3つの推定上の結合部位について分析した。Ets-1タンパク質がGnT-V遺伝子調節領域のそれらの推定上の結合部位に結合できるか否かを決定するために、ゲル移動性シフト実験を、GnT-V遺伝子の5'-非翻訳領域における3つの推定上のEts-結合部位に対応する、24-bpのGnT-Vプロモーター由来のオリゴヌクレオチド、E266, E565及びE728を用いて行なった。最初に、MOLT4細胞のインビトロ転写され/翻訳された切断Ets-1タンパク質及び核抽出物がEts-1コンセンサス配列に実際に結合することを確かめた (図6)。

【0028】Ets-1の完全な長さの配列をコードするフラグメントを、ポリメラーゼ鎖反応 (PCR) により得、そして次に、pSVK3ベクター (Pharmacia) 中にクローン化した。そのヌクレオチド配列を一般的な配列分析により確かめた。このプラスミドをXhoI/SacIにより消化し、そしてEts-1cDNAをpET19bベクター (Novagen) のXhoI-SacI部位中にサブクローン化し、ここでタンパク質がE. coli BL21 (DE3) においてT7プロモーターの制御下で発現された。

【0029】Ets-1コンセンサス結合配列のGnT-Vの上流の調節領域の推定上のEts-結合配列を含むDNAフラグメントを次の通りに合成した: E266, 5'-GGGAGTGAGGATGATGTAGGGAAG-3' (配列番号: 1); E565, 5'-CTTGTTAAAGGATAGGCTGTGGAC-3' (配列番号: 6); E728, 5'-ATGGGGCAGAGGAACCTTACGTTAT-3' (配列番号: 2); EB, 5'-CGGCCAACCGGAAGCATGTGC-3' (配列番号: 7)、mE266, 5'-GGGAGTGAGTATGATGTAGGGAAG-3' (配列番号: 8)、及びmE728, 5'-ATGGGGCAGAGTAACCTTACGTTAT-3' (配列番号: 9)。相補的オリゴヌクレオチドをアニールし、そしてプローブ又は競争体として使用した。プローブを [γ -³²P] dATP (Amersham Corp.) 及びT4ポリヌクレオチドキナーゼ (Takara, Osaka, Japan) によりそれらの5'-延張端でラベルした。

an) によりそれらの5'-延張端でラベルした。

【0030】ゲル移動性シフトアッセイに関しては、DNA (10, 000cpm, ³²Pラベルされた) 及び核抽出物又はインビトロ転写/翻訳により調製されたタンパク質を、65mMのKCl、25mMのトリス-HCl (pH7.9)、6mMのMgCl₂、0.25mMのEDTA及び10%グリセロールを含む緩衝液と共に20mlの合計体積で混合した。2 μ gのポリ (dI-dC) (Sigma) をまた、個々の反応混合物に添加した。競争分析のために、タンパク質を過剰のラベルされていないオリゴヌクレオチドの存在下でインキュベートした。

【0031】図7において、 γ -³²P-ラベルされたオリゴヌクレオチドプローブE266 (レーン2)、E728 (レーン7) 及びE565 (レーン12) をインビトロ転写され/翻訳されたEts-1タンパク質と共にインキュベートした。競争分析のために、前記タンパク質を過剰のラベルされていないオリゴヌクレオチドE266 (レーン3~5)、E728 (レーン8~10) 及びE565 (レーン13) の存在下でインキュベートした。図8において、 γ -³²P-ラベルされたオリゴヌクレオチドプローブE266 (レーン2) 及びE728 (レーン6) がMOLT4細胞の核抽出物と共にインキュベートされた。

【0032】競争及びスーパーシフトアッセイのために、100倍のラベルされていないオリゴヌクレオチド又は1 μ gの抗-Ets-1抗血清をそれぞれ添加し、続いて、電気泳動の前、室温で1時間インキュベートした (図8レーン3及び4、並びに7及び8)。図9、mE266及びmE728プローブはE266及びE728プローブの点変異であり、GnT-Vプロモーターにおける3個のGGA配列をGTAに転換した。それらのラベルされていないオリゴヌクレオチドが過剰添加され、そしてMOLT4核抽出物の反応混合物と共にインキュベートされた (図9レーン4及び7)。

【0033】スーパーシフトアッセイのためには、Ets-2タンパク質と交差反応しない抗-Ets-1 IgG (Cambridge Research Biochemicals) を、反応混合物に添加し、続いて室温で1時間、インキュベートした。サンプルを、6%の非変性ポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド: ビスアクリルアミド、29:1)、0.5 \times TBE (1 \times TBE=89mMのトリス、89mMのホウ酸、2mMのEDTA) 上に負荷し、そして次に電気泳動を4 $^{\circ}$ Cで150Vで1時間、行なった。電気泳動の後、ゲルをゲルドライヤーにより乾燥せしめ、そして次に、X-線フィルム (Kodak, Japan) に暴露した。

【0034】その結果、放射性ラベルされたE266、E565及びE728をインビトロ転写され/翻訳されたEts-1タンパク質と共に、前記のようにインキュベートした場合、タンパク質-DNA複合体は、E266及びE728の両者の場合、遅延されたが、しかしE

565オリゴヌクレオチドの場合はそうではなかった(図7、レーン2、7及び12)。競争分析の結果を図7に示す。過剰のラベルされていないE266、E565及びE728オリゴヌクレオチドを用いた。

【0035】ラベルされていないE266及びE728オリゴヌクレオチドはラベルされたE266及びE728プローブに結合するタンパク質と競争することが見出され、GnT-V調節領域のEts-結合部位へのEts-1タンパク質の特異的及び高い親和性の結合が示された。タンパク質-DNA複合体は過剰のE266又はE728のいずれかと効果的に交差-競争するが、しかし突然変異誘発されたEts結合配列を含むオリゴヌクレオチドmE266及びmE728は競争しなかった(データは示されていない)。

【0036】これらの結果は、Etsコンセンサス配列を認識するインビトロ転写され/翻訳された切断Ets-1タンパク質が-266及び-728の位置で、GnT-Vプロモーター配列、すなわち5'-GGGAGTGAGGATGATGTAGGGAAG-3' (配列番号: 1) 及び5'-ATGGGGCAGAGGAAGTACGTTAT-3' (配列番号: 2) に結合できることを示唆する。

【0037】GnT-Vプロモーター由来のEts-結合部位がEts-1を発現する細胞における核因子に関与しているか否かを決定するために、Ets-1タンパク質を高く発現するMOLT4細胞から調製された核抽出物と共にインキュベートされた同じGnT-Vプロモーター由来のEts-結合配列を用いてゲル移動性シフトアッセイを行なった結果を図8に示す。放射性ラベルされたE266及びE728オリゴヌクレオチドがMOLT4細胞から調製された核抽出物と共にインキュベートされる場合、遅延されたタンパク質-DNA複合体が検出され(図8レーン2及び6)、そして特異的結合が競争分析上で同定された(図8、レーン3及び7)。

【0038】Etsの結合はEts-特異的抗血清により確認された。すなわち、抗-Ets-1 IgGの添加はタンパク質-DNA複合体との競争をもたらした(図8、レーン4及び8)。しかし、突然変異誘発されたEts結合配列を含むmE266及びmE728オリゴヌクレオチドは競争しなかった(図9、レーン4及び7)。それらの結果は、GnT-V遺伝子のHuCC-T1-制限されたプロモーター領域の24bpのEts-結合部位へのEts-関連因子の結合を示した。

【0039】実施例4. ヒトGnT-Vプロモーターのトランス活性化

生存細胞におけるGnT-V転写の調節におけるEts-1の重要性を確かめるために、Ets-1 cDNAをpSVK3ベクター中にサブクローンした。ここでSV40プロモーターが哺乳類細胞においてc-Ets-1 cDNAの発現を駆動する。GnT-V遺伝子がE

ts刺激のみにより活性化され得るか否かを決定するために、2 μ gの構成体pGV-1460/-440を、1 μ g(図10、レーン4)又は2 μ g(図10、レーン5)のEts-1発現プラスミドSVETS-1と共にHuCC-T1細胞中に同時トランスフェクトした。図10に示されるように、HuCC-T1細胞がSVETS-1及びpGV-1460/-440と共に過渡的に同時トランスフェクトされた後、ルシフェラーゼ活性はEts-1発現ベクター1 μ gの存在下で2.1倍以上高まり、他方プロモーター活性はEts-1発現ベクター2 μ gの存在下で低下した。

【0040】pGV-362/+23を、1 μ g(図11、レーン4)又は2 μ g(図11、レーン5)のSVETS-1と共にHuCC-T1細胞中に同時トランスフェクトされた。相対ルシフェラーゼ活性を、3~5回の独立した実験について平均 \pm S.D.として表す。SVETS-1及びpGV-362/+23をHuCC-T1細胞中に同時トランスフェクトした場合、プロモーター活性が用量依存的に上昇することが観察できた(図11)。

【0041】このトランス活性化結果は、Ets-1がその結合部位を含むGnT-Vプロモーターを活性化することができることを示唆する、その調節機能をより詳細に研究するために、アンチセンスEts-1 mRNAを用い、HuCC-T1細胞におけるヒトGnT-V遺伝子のプロモーター活性を上昇させるEts-1の形成を阻害した。

【0042】HuCC-T1細胞を、2 μ gのpGV-1460/-440(図12)又はpGV-362/+23(図13)構成体、及び種々の量のアンチセンスEts-1発現プラスミドSVETSAにより同時トランスフェクトされた。相対的なルシフェラーゼ活性が3~5回の独立した実験について平均 \pm S.D.として表す。図12に示す、pGV-1460/-440は、アンチセンス発現プラスミド(SVETSA)1 μ gと共に同時トランスフェクトされる場合、ルシフェラーゼ活性の60%低下を引き起こし、そしてアンチセンス発現プラスミド10 μ gと共に同時トランスフェクトされる場合、ルシフェラーゼ活性の100%低下を引き起こした。しかし、pGV-362/+23のプロモーター活性の変化は観察されなかった(図13)。これらの発見は、転写因子Ets-1タンパク質がGnT-V遺伝子転写介在の複雑な転写機構を陽的に調節することを示唆するものである。

【0043】

【配列表】配列番号: 1

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジ: 直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGGAGTGAGG ATGATGTAGG GAAG

24

【0044】配列番号：2

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGGGGCAGA GGAAGTTACG TTAT

24

【0045】配列番号：3

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGACGCGTTC TTACCATATA GAAC

24

【0046】配列番号：4

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGACGCGTGC CTAGATGATC AGTC

24

【0047】配列番号：5

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGCTCGAGGC CTCTTACTGT TTTC

24

【0048】配列番号：6

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CTTGTTAAAG GATAGGCTGT GGAC

24

【0049】配列番号：7

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

CGGCCAACCG GAAGCATGTG C

21

【0050】配列番号：8

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGGAGTGAGT ATGATGTAGG GAAC

24

【0051】配列番号：9

配列の長さ：24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジ：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

ATGGGGCAGA GTAAGTTACG TTAT

24

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、癌の転移に関与すると予想される分枝したグルカンの形成を示す図である。

【図2】図2は、GnT-V遺伝子の5' 非翻訳領域の種々の構造体示す図である。GnT-V調節領域におけるEts結合部位が位置-266、-565及び-728で存在する。SalI、XbaI及びPuvIIは特定

の制限部位を示す。左側の数字は、上記に示されるゲノム地図に関連する個々の欠失構造体の起原を示す。矢印は初期の転写部位を示す。示される制限部位は次の通りである：S, SalI; X, XhoI; H, HinfI。

【図3】図3は、HuCC-T1細胞における基本的なプロモーター活性ルシフェラーゼ相対活性として示す。

【図4】図4は、HuCC-T1細胞中へのトランスフェクションに基づいての、種々のGnT-Vプロモーターの転写活性をルシフェラーゼ相対活性として示すグラフである。

【図5】図5は、HuCC-T1細胞中へのトランスフェクションに基づいての、種々のGnT-Vプロモーターの転写活性をルシフェラーゼ相対活性として示すグラフである。

【図6】図6は、ルシフェラーゼ遺伝子に直結されたGnT-Vプロモーター及び欠失構成物のHuCC-T1細胞での活性を示す図である。プローブとして、コンセンサス配列プローブを使用。

【図7】図7は、図6と同様であるが、プローブとしてE266、E728及びE565を用いた結果を示す。

【図8】図8は、GnT-V遺伝子の制御領域についての、Ets-1蛋白質を用いてのゲル移動シフトアッセイの結果を示す図である。プローブとしてE266及び

E728を使用。

【図9】図9は、図8と同様であるが、プローブとしてE266、E728、mE266及びmE728を用いた結果を示す図である。

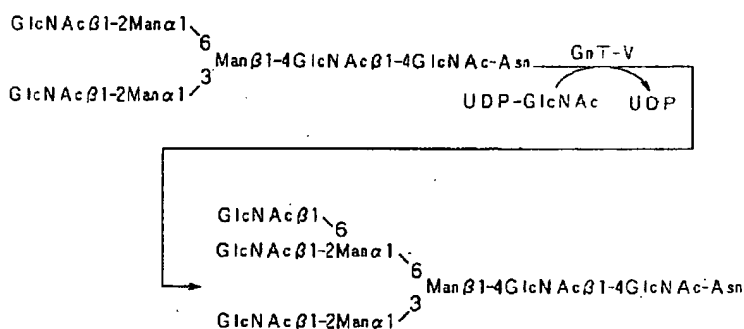
【図10】図10は、HuCC-T1細胞における、ヒトGnT-V遺伝子のプロモーター活性に対するEts-1蛋白質の効果を示すグラフである。

【図11】図11は、HuCC-T1細胞における、ヒトGnT-V遺伝子のプロモーター活性に対するEts-1蛋白質の効果を示すグラフである。

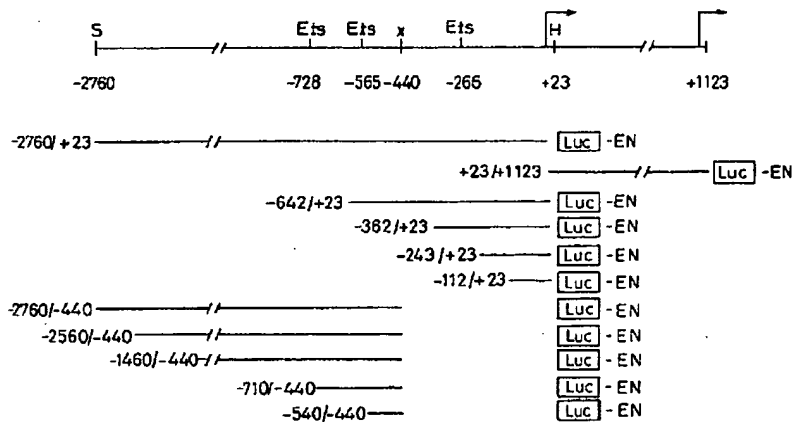
【図12】図12は、アンチセンスEts-1遺伝子によるGnT-Vプロモーター発現の抑制を示すグラフである。

【図13】図13は、アンチセンスEts-1遺伝子によるGnT-Vプロモーターの活性を示すグラフである。

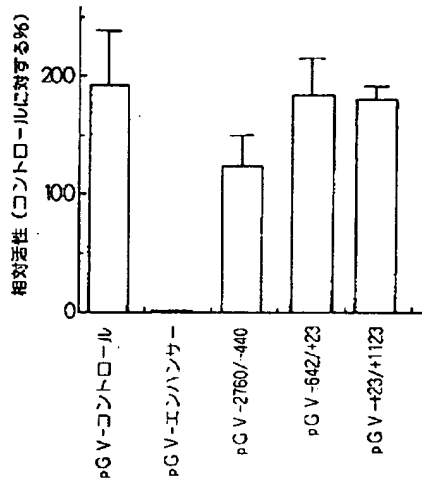
【図1】



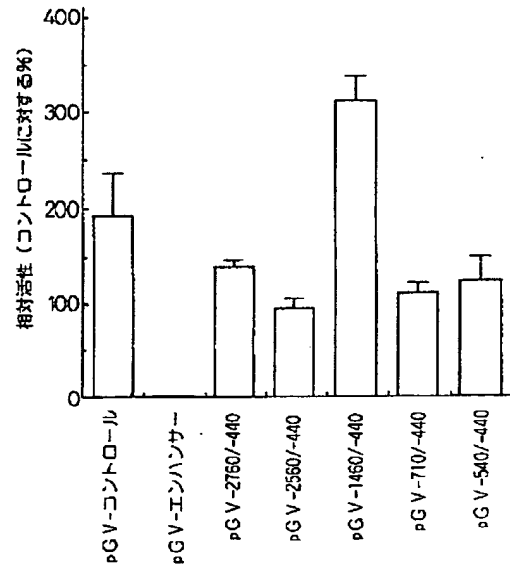
【図2】



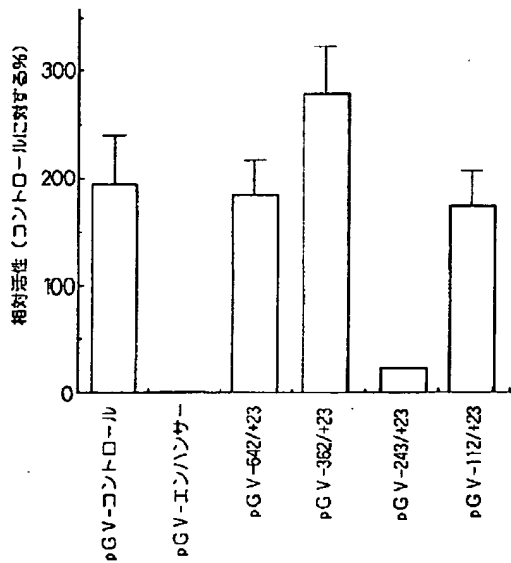
【図3】



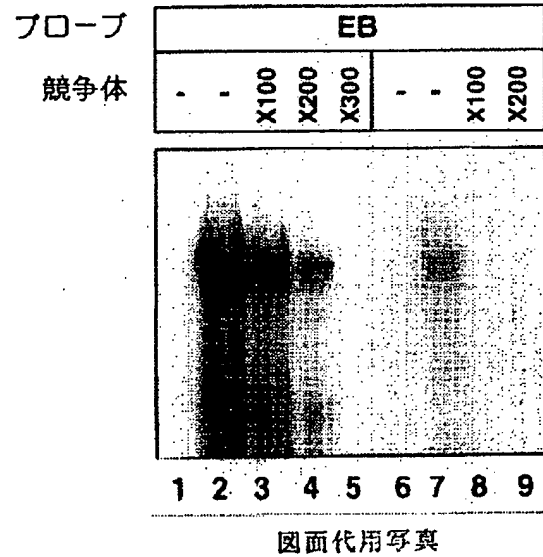
【図4】



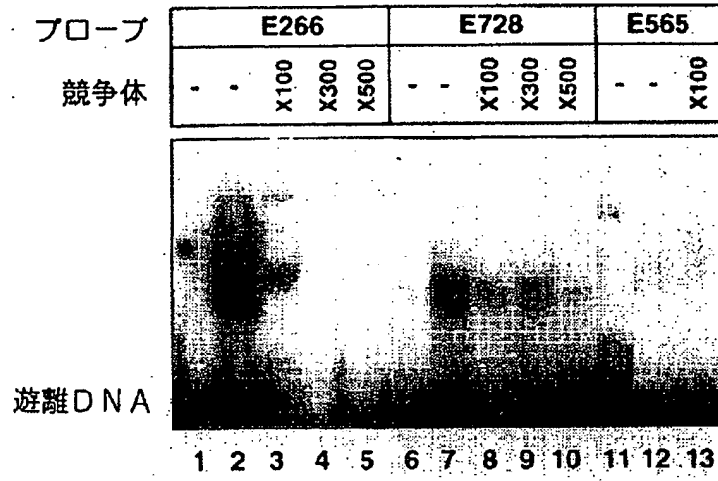
【図5】



【図6】

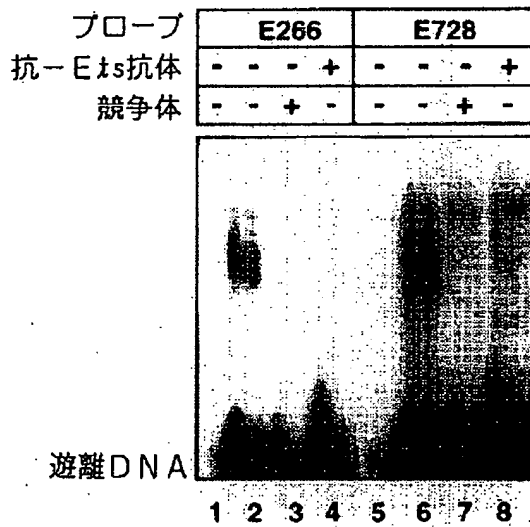


【図7】



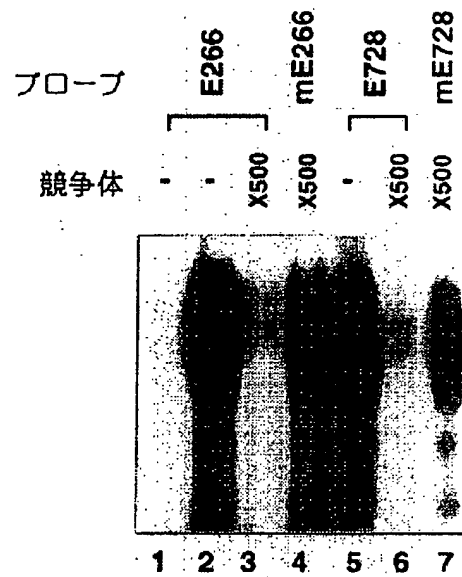
図面代用写真

【図8】



図面代用写真

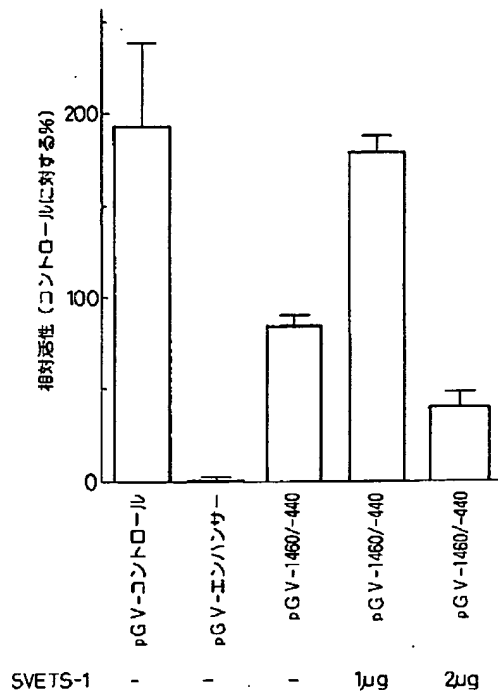
【図9】



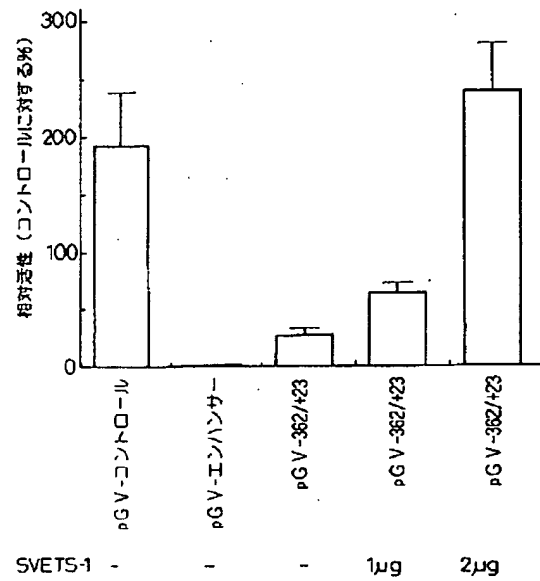
図面代用写真

BEST AVAILABLE COPY

【図10】

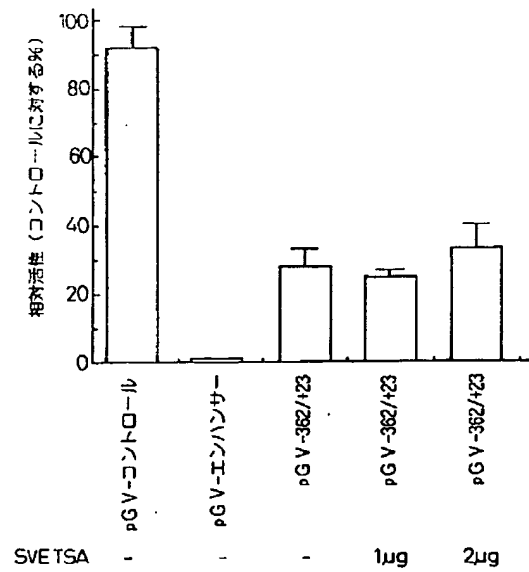
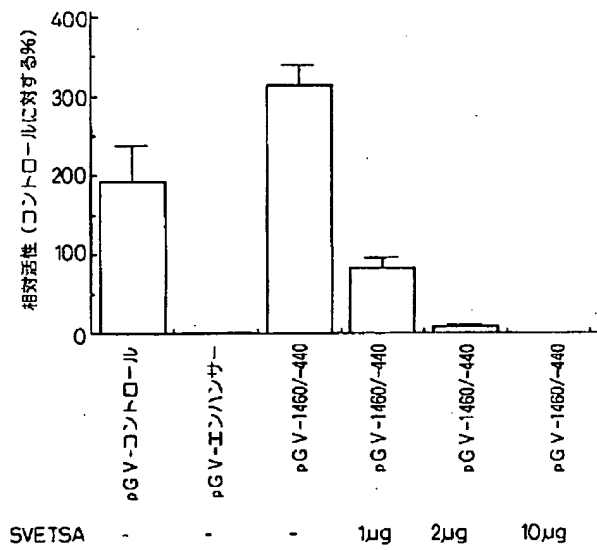


【図11】



【図13】

【図12】



フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶

// C 1 2 N 15/09

識別記号

F I

C 1 2 N 15/00

A